

人脑胶质瘤组织中趋化因子受体和血管内皮细胞生长因子的表达*

田 陈¹, 吴 芳¹, 于海云¹, 郭郑旻¹, 李 宁¹, 李红梅^{2**}

(1. 首都医科大学电力教学医院 病理科, 北京 100073; 2. 贵州医科大学 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] **目的:** 探讨趋化因子受体(CXCR7)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)在胶质瘤患者肿瘤组织的表达及其与胶质瘤发生发展的关系。**方法:** 应用组织芯片技术及免疫组织化学 SP 法, 检测 10 例正常脑组织和 69 例胶质瘤组织 CXCR7 和 VEGF 的表达水平, 比较不同病理分级胶质瘤组织中 CXCR7 和 VEGF 的表达水平, 采用 Spearman 法分析胶质瘤组织中 CXCR7 和 VEGF 的相关性。**结果:** 正常脑组织(对照组)、低级别胶质瘤组及高级别胶质瘤组患者脑组织中 CXCR7、VEGF 的表达阳性率逐渐升高, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); CXCR7、VEGF 表达随胶质瘤恶性程度的增加表达逐渐上调, 呈正相关($r = 0.327, P < 0.01$); Spearman 等级分析显示, CXCR7 与 VEGF 在 69 例胶质瘤组织中的表达呈正相关关系($r = 0.327, P < 0.01$)。**结论:** CXCR7 及 VEGF 在胶质瘤组织中表达上调, 且随着肿瘤恶性程度的增高而增强, CXCR7 和 VEGF 在胶质瘤的发生、发展过程中可能起协同作用。

[关键词] 胶质母细胞瘤; 趋化因子受体; 血管内皮细胞生长因子; 免疫组织化学; 芯片分析技术; 基因表达

[中图分类号] R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)09-1046-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.09.012

Expression of CXCR7 and VEGF in Gliomas of Human

TIAN Chen¹, WU Fang¹, YU Haiyun¹, GUO Zhengmin¹, LI Ning¹, LI Hongmei²

(1. Department of Pathology, Capital Medical University Dianli Hospital, Beijing 100073, China;

2. Teaching Division of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of CXCR7 and VEGF in tissue of gliomas, and the relationship between CXCR7, VEGF and pathologic grading as well as tumorigenesis of gliomas.

Methods: Immunohistochemistry (SP) tissue chip were applied to evaluate the expression of CXCR7 and VEGF in 10 cases of normal controls and 69 cases of human gliomas; comparing expression of CXCR7 and VEGF in different pathological gradings of gliomas; adopting Spearman assay to analyze relevance of CXCR7 and VEGF in gliomas tissue. **Results:** The positive expression rates of CXCR7 and VEGF gradually increased in healthy brain tissue of control group, low grade gliomas group and high grade gliomas group, comparison between groups was statistical significant ($P < 0.05$). The expression of CXCR7 and VEGF upregulated with the increase of malignant level of gliomas, which was positively correlated ($r = 0.327, P < 0.01$). Spearman grading analysis indicated that expression of CXCR7 and VEGF was positively correlated in 69 cases of gliomas tissue ($r = 0.327, P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of CXCR7 and VEGF in gliomas was upregulated and the positive reaction rate of CXCR7 and VEGF were increased with the increase of tumor malignancy. The results indicate CXCR7

*[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 LH 字(2014)7084]

** 通信作者 E-mail: 583869942@qq.com

网络出版时间: 2018-09-20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180920.1149.013.html>

and VEGF may play a co – ordinating role in the tumorigenesis of gliomas.

[**Key words**] gliomas; chemokine receptor; vascular endothelial growth factor; immunohistochemistry; microchip analytical procedures; gene expression

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤之一,其中高级别胶质母细胞瘤大约占颅内肿瘤的 12% ~ 15%,且患者的总体存活情况很差^[1-2]。高级别胶质瘤细胞能产生增强迁移的细胞外基质及分泌蛋白溶解酶,促进胶质瘤细胞沿着这种基质进行浸润。研究发现趋化因子受体(chemokine receptor, CXCR7)作为分泌蛋白家族中的一员,在神经胶质瘤细胞株中均有表达^[3-5],并参与了肿瘤的生长、侵袭及血管形成^[6-7]。研究还发现高级别胶质瘤细胞能够产生多种成血管因子,促进肿瘤血管生成,是胶质瘤相关血管形成的重要介质,其中就包括了血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[8]。目前采用组织芯片技术研究 CXCR7 与 VEGF 在胶质瘤中表达的相关研究甚少,本文采用组织芯片技术结合免疫组织化学 SP 法检测 CXCR7、VEGF 在胶质瘤组织芯片中的表达水平,分析其与胶质瘤发生发展的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2012 年 8 月 ~ 2016 年 8 月收治的 69 例脑胶质瘤患者,其中男 42 例、女 27 例,23 ~ 78 岁,平均(49.2 ± 5.1)岁,所有患者在手术前均未接受免疫性治疗。根据 WHO(2007 版)中枢神经系统肿瘤的分类标准分为低级别组(Ⅱ级,31 例)及高级别组(其中Ⅲ级 12 例、Ⅳ级 26 例)。选取同期脑外伤行颅内减压术患者 10 例作为对照。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器及试剂 主要仪器有免疫组化相关仪器、脱水机、石蜡切片机(Leica,德国)、电热恒温干燥箱、倒置光显微镜及成像系统(Olympus,日本),主要试剂有鼠抗人 CXCR7 单克隆抗体、兔抗人 VEGF 单克隆抗体(中杉生物技术开发有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS, Sigma, 美国)及 DAB 显色试剂盒(武汉博士德,中国)。

1.2.2 组织芯片蜡块制作及切片 肿瘤组织标本常规处理后 HE 染色,显微镜下标记出目标区域,在相应的蜡块上做标记。空白蜡块上打直径 2 mm 孔,用金属空心针(2 mm)从已定位的目标蜡块上取出组织,转移到已打孔的空白蜡块相应位置处,

切片厚度 5 μm。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 EnVision 法,抗体浓度 CXCR7 1:100,VEGF 1:100。组织芯片常规脱蜡,3% 双氧水消除内源性过氧化物酶,血清封闭 1 h,分别滴加 CXCR7、VEGF 一抗,4 ℃ 孵育过夜,PBS 清洗,滴加辣根过氧化物酶标记二抗,孵育 1 h,DAB 显色,冲洗,复染,脱水,透明,封片。用 PBS 液代替一抗做阴性对照。

1.2.4 染色结果判定 CXCR7 和 VEGF 主要表达于细胞质中,也有部分表达于细胞膜,在正常的血管内皮有表达,以出现棕黄色颗粒判断为阳性。染色强度计分无色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕黑色为 3 分;阳性细胞百分比无阳性细胞为 0 分,阳性细胞数 ≤ 10% 为 1 分、11% ~ 50% 为 2 分、51% ~ 75% 为 3 分、>75% 为 4 分;染色强度计分加上阳性细胞百分比计分作为阳性判断标准,0 ~ 3 分为“-”、4 ~ 6 分为“+”、7 ~ 9 分为“++”及 10 ~ 12 分为“+++”。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行分析, CXCR7 和 VEGF 阳性率比较采用 χ^2 检验, CXCR7 和 VEGF 的相关性采用 Spearman 相关性分析,用相关系数(r)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCR7 及 VEGF 表达

如图 1 所示, CXCR7、VEGF 在 3 组脑组织中均有表达,正常脑组织(对照组)、低级别组及高级别组脑组织中 CXCR7、VEGF 的表达阳性率逐渐升高,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1,表 2。相关分析结果显示 CXCR7、VEGF 表达随胶质瘤恶性程度的增加表达逐渐上调,呈正相关($r = 0.327, P < 0.01$)。

2.2 脑胶质瘤中 CXCR7 与 VEGF 表达的相关性分析

69 例胶质瘤组织中 CXCR7 与 VEGF 表达的关系如表 3 所示, Spearman 等级分析结果显示, CXCR7 与 VEGF 在胶质瘤组织中的表达呈正相关性($r = 0.327, P < 0.01$)。

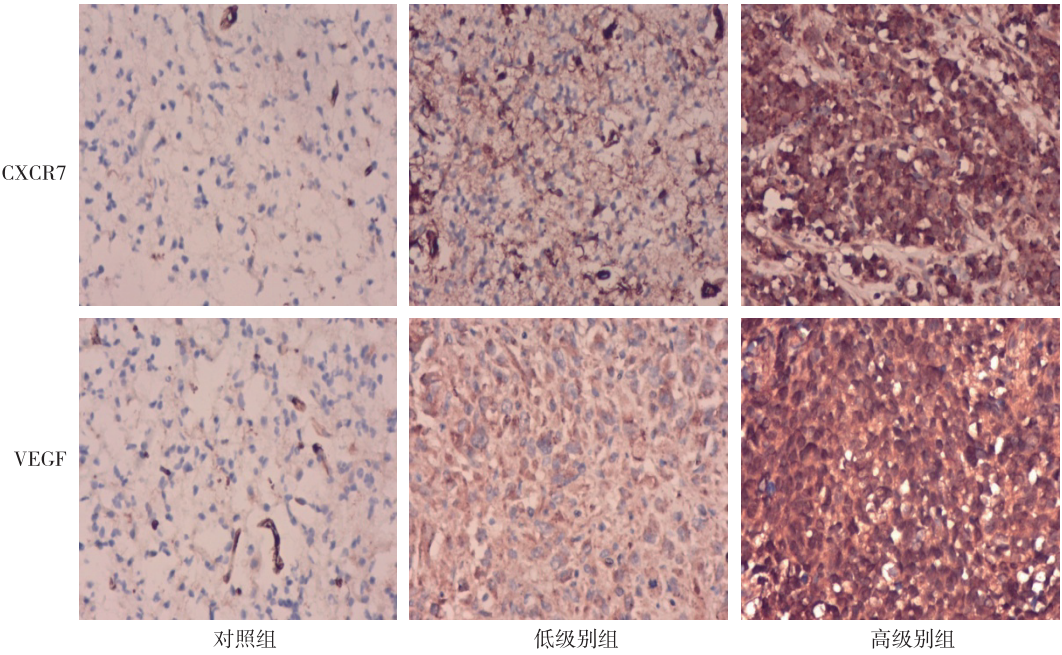


图 1 3 组脑组织中 CXCR7 及 VEGF 表达 (Envision, ×200)

Fig. 1 Expression of CXCR7 and VEGF in brain tissues of three groups gliomas

表 1 3 组脑组织中 CXCR7 表达

Tab. 1 Expression of CXCR7 in three groups of brain tissues

组别	n	CXCR7 表达(n,%)				总阳性
		-	+	++	+++	
对照组	10	9(90.0)	1(10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
低级别组	31	7(22.5)	23(74.2)	1 (3.3)	0 (0.0)	24 (77.4)
高级别组	38	0 (0.0)	0 (0.0)	10(26.3)	28(73.7)	38(100.0)

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与低级别组比较, $P < 0.05$

表 2 3 组脑组织中 VEGF 表达

Tab. 2 Expression of VEGF in three groups of brain tissues

组别	n	VEGF 表达(n,%)				总阳性
		-	+	++	+++	
对照组	10	8(80.0)	2(20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2(20.0)
低级别组	31	16(51.6)	12(38.7)	3 (9.7)	0 (0.0)	15(48.4)
高级别组	38	6(15.8)	0 (0.0)	12(31.6)	20(52.6)	32(84.2)

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与低级别组比较, $P < 0.05$

表 3 69 例胶质瘤组织中 CXCR7 与 VEGF 表达的关系

Tab. 3 Relationship of expression of CXCR7 and VEGF in 69 cases of gliomas tissue

项目	VEGF	
	-	+
CXCR7 -	5	2
+	17	45

3 讨论

胶质瘤恶性程度越高,侵袭、浸润的能力越强,而高级别胶质瘤侵袭、浸润机制中的一个重要方面是肿瘤细胞能产生增强迁移的细胞外基质以及产生分泌蛋白溶解酶促进肿瘤细胞沿着这种基质进行浸润。本研究发现 CXCR7 随胶质瘤恶性度的增

加,表达明显上调,进一步证实了作为分泌蛋白家族中的一员,CXCR7 在肿瘤的发生发展中,CXCR7 可能参与了肿瘤细胞的转移、浸润^[9-12]。

胶质瘤肿瘤组织血供非常丰富,随着肿瘤细胞侵袭性的增强,组织学上相应表现为特征性的微血管增生。VEGF 能促进肿瘤血管生成,增加血管通透性,以及调节骨髓来源细胞的迁移。研究发现,胶质瘤中恶性度越高的肿瘤细胞通常高表达血管生成的基因。Bruce 等首次证实胶质瘤细胞合成与分泌 VEGF^[13]。本研究结果显示,胶质瘤肿瘤组织中 VEGF 的含量明显高于正常脑组织,且随肿瘤恶性级别的增高,表达明显上调,提示胶质瘤肿瘤组织中 VEGF 蛋白含量的高低可作为胶质瘤预后的判断指标。本研究还发现,在胶质瘤肿瘤组织中 CXCR7 和 VEGF 表达存在正相关性($P < 0.01$)。Madden 等^[14]运用原位杂交染色的方法在对胶质瘤相关血管的研究中发现,CXCR7 在肿瘤相关血管中高表达,而在正常脑组织相关血管中表达较低,表明 CXCR7 与肿瘤血管形成密切相关。还有研究发现,过度表达 CXCR7 会使前列腺癌产生更多的 IL-8 及 VEGF,相应地降低 CXCR7 的表达也会减少这两者的分泌量^[15],研究结果提示,CXCR7 可能通过上调 VEGF 的表达,降低细胞外基质的黏附性,为肿瘤细胞侵袭、浸润、和血管生成创造条件。在最近有研究发现在肝细胞中刺激 VEGF 能上调 CXCR7mRNA 和蛋白表达^[16]。综上研究结果,推测在人类胶质瘤中,CXCR7 和 VEGF 可能通过某些信息通路,相互促进分泌,在胶质瘤的浸润转移和肿瘤发展中起到协同作用。但是由于本次研究所用的组织芯片,每例组织片的面积相对较小,肿瘤的代表性可能有局限,同时本研究的样本量较小,研究结果还有待进一步扩大样本量进行研究。

综上,本研究结果显示 CXCR7、VEGF 表达随胶质瘤恶性程度的增加表达逐渐上调,并且 CXCR7 与 VEGF 在胶质瘤肿瘤发展、侵袭和转移过程中可能起协同作用,可以作为判断胶质瘤生物学行为的指标,指导临床预后的评估。同时,也将为胶质瘤的靶向治疗提供新线索。

4 参考文献

[1] HE J,JI X,LI Y,et al. Subchronic exposure of benzo(a) pyreneinterfers with the expression of Bcl-2,Ki-67,C-myc

and p53,Bax,Caspase-3 in sub-regions of cerebral cortex and hippocampus [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2016,68(2-3):149-156.

[2] JIANG H,ZHAO P J,SU D,et al. Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinb-resistant non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Med Rep*, 2014,9(6):2265-2272.

[3] YAMADA K,MAISHI N,AKIYAMA K,et al. CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property [J]. *Int J Cancer*, 2015,137(12):2825-2836.

[4] GOLDMANT T, DROMANN D ,RADTKEJ, et al. CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissues; possible regulation upon chemotherapy [J]. *Virchows Arch*, 2008,452(3):347-348.

[5] BENREDJEM B, GIRARD M, RHAINDS D, et al. Mutational analysis of atypical chemokine receptor(ACKR3/CXCR7) interaction with its chemokine ligands CXCL11 and CXCL12[J]. *J Biol Chem*, 2017,292(1):31-42.

[6] DUDA DG, KOZIN SV, KIRKPATRICK ND, et al. CXCL12 (SDF 1 alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibitor; an emerging sensitizer for anticancer therapies [J]. *Clin Cancer Res*, 2011,17(8):2074-2080.

[7] BIANCO AM, UNO M, OBA-SHINJO SM, et al. CXCR7 and CXCR4 expressions in infiltrative astrocytomas and their interactions with HIF1 α expression and IDH1 mutation [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015,21(2):229-240.

[8] 杜权,俞文华,董晓巧. OPN 和 MMP-9 在胶质瘤中的表达及其临床意义[J]. *浙江医学*, 2009,31(6):729-731.

[9] HATTERMANN K, MENTLEIN R. An infemal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology [J]. *Ann Anat*, 2013,195(2):103-110.

[10] LIU Z, YANG L, TENG X, et al. The involvement of CXCR7 in modulating the progression of papillary thyroid carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2014,191(2):379-388.

[11] KALLIFATIDIS G, MUNOZ D, SINGH RK, et al. β -arrestin-2 counters CXCR7-mediated EGFR transactivation and proliferation. [J]. *Mol Cancer Res*, 2016,14(5):493-503.

[12] ZHU X, BAI Q, LU Y, et al. Expression and function of CXCL12/CXCR4/CXCR7 in thyroid cancer [J]. *Int J Oncol*, 2016,48(6):2321-2329.